

## (9) 食品製造・加工における環境型の同定検査技術の研究開発

(平成26年度～平成28年度)

### 1. 研究のねらい

消費者の食の安全性に対する意識の高まりを背景に、函館地域の企業からもクレーム処理に関する相談が多く寄せられており、原因究明に役立つ迅速な同定検査技術に対する需要が高まっている。また、検査技術においては環境負荷の低減化が重要視され始めている。一般的な異物同定で良く使われている赤外分光分析法は、近年、臭素などのハロゲン化物を直接使用しない ATR 法が開発され普及しているが、この方法が適用できない例が工業技術センターへの相談に散見される。また、同定に利用できる分光スペクトルデータは、食品の異物のような混成物に関して十分な蓄積はない。また生物系異物の同定に有効である DNA 分析では、DNA 抽出精製で使用するフェノール等の劇薬が排出されることや、生産地が限定される生物資源の DNA 情報がほとんど無いために同定が困難となることが課題である。また、食品の変敗では多くの微生物が関与しており、従来の培養法や DNA シーケンス法によりそれらを同定するには多くの時間が必要である。

そこで本研究は、同定検査技術である 1) 分光分析と顕微鏡及び 2) DNA 分析について、環境負荷の低減化及び簡易迅速化について検討することとした。本テーマは、これまでに地元企業から多くの相談が寄せられている異物に関連しており、実際の事例等を参考に企業と連携して進めることが可能であり、さらに食品に関係する企業が集積する函館地域においては、得られた成果を速やかに移転することが可能である。

### 2. 研究の方法

1) 分光分析と顕微鏡：加工食品の流通後、同定検査の対象となる相談で赤外分光分析が用いられるケースは、この 5 年間で 250 例を超えるが、これらの相談事例について共通性がないか検討した。相談事例のうち、ATR 法の適用が難しいと判断される例を参考にして、顕微鏡と FT-IR 装置とを組み合わせた 2 次元マッピング法という分析方法の有効性と適合性について検討した。この研究では光学顕微鏡鏡の観察方法の切り替えを活用した検査技術の向上を H27 年度に検討しており、本年度は擬似マッピング法による検査方法を検討した。擬似マッピング法は本研究で便宜的に使用している呼称である。平面である位置情報と取得データをリンクさせた 2 次元マッピング法の一つで、顕微赤外分光光度計の設置がない場合の代替法として考案した。被験物に対する検査スポットの位置情報と取得した赤外分析データを解析して、異物のある位置を割り出し、後追いで顕微鏡観察をすることで、異物の発見と同定を可能とする手法を検討した。

2) DNA 分析：H27 年度までの検討により、ワカメを試料にフェノール等の劇薬を使用しない簡易抽出法で得られた DNA を用い、次世代シーケンス解析 (Ion Torrent PGM System) を行った結果、これまで未知であった葉緑体 DNA のほぼ全長 (約 130,600 塩基) を取得で

きることが分かった。そこで H28 年度は、次世代シーケンサで得られる DNA 情報の正確性を調べるため、以下の試験を行った。試料には、H27 年度と異なる個体のワカメを用い、簡易法により DNA を抽出した。塩基配列の解析は、H27 年度と同様に酵素により DNA を約 200 塩基に断片化後、次世代シーケンサで分析し、さらに近縁種であるマコンブ葉緑体 DNA 配列を参照配列としたマッピング解析からワカメ葉緑体 DNA の取得を試みた。次いで得られた葉緑体 DNA の塩基配列について、H27 年度に取得した個体との比較解析を行った。さらに 2 個体間で異なる塩基について、キャピラリーシーケンサ (ABI PRISM 3130) による再解析を行い、DNA 情報の正確性を評価した。

### 3. 研究成果の概要

1) 分光分析と顕微鏡: 相談を受けた事例のクレームに共通性はほとんどないことが判った。業種や地域的な特徴として、食品包装材のプラスチックや貝殻の無機成分は複数回あるが、どれも判断の有力条件となる形状の残留については共通するものが無かった。相談の中で 2 次元マッピング法が有効となるケースがあることが判った。例えば、汚れの一種と見られるが、ATR 法での解析では混成成分となり不詳の判定を 2 次元マッピング法では回避できると思われた。原材料に混在、埋没して発見される例で、原材料からの差スペクトルの取得による 2 次元マッピングが有効とされた。

擬似マッピングによる検査方法が検討される例は、液体状の試料に対してフィルタに補足された検査対象物の全体が、試料に由来するとみられる混在物の全面に観察されるような場合で、この中に異物があるかどうかの判定に適用した。無作為にフィルタ面を ATR 法で 16 スポット検査し、赤外分光分析のデータを比較する。この中から他と異なるスペクトルを示すスポットを、位置情報から割り出して、顕微鏡検査を実施した。この手順で検査の結果、微生物の死骸による汚染を発見できるなどの実施例を示すことができたので、異物への検査能力があることが知れた。この方法では、通常の ATR 法では検査面が裏返しになるので目視することは出来ないから、試料の検査面に圧力をかけた痕が残ることを位置情報に活用する。作業がルーチンであり、簡便なため、ロボットの導入による高能率な作業手順として発展させることができる利点があると思われる。検査の面積率は 19.6% であるため、5 回のルーチン作業で全単位面の検査が可能になる。

2) DNA 分析: 次世代シーケンサによる解析の結果、H27 年度と同様にマコンブ葉緑体 DNA の全長 (約 130,600 塩基) をほぼカバーする塩基配列情報を取得することができた。また部分的に欠損しており、完全長ではないことも H27 年度と同様であった。2 個体の葉緑体 DNA を比較した結果、それぞれの欠損部分は、ほぼ同じ位置に見られたことから、本研究で用いた DNA 断片化酵素は、DNA の切断に多少の偏りがあることが考えられた。現在、複数のメーカーから DNA 断片化酵素が市販されており、酵素の選定を検討することにより、欠損部分の少ない塩基配列情報を取得することが可能と思われる。一方、取得できた塩基配列の

比較から、2 個体間の違いは僅かに 3 塩基であった。違いの見られた 3 塩基を含む各領域について、さらにキャピラリーシーケンス解析を行った結果、3 塩基は全て存在したことから、正確性の高い DNA 情報が得られていると考えられた。本研究で検討した簡易 DNA 抽出法はフェノール等の劇薬を使わない方法であり、抽出した DNA は次世代シーケンサ等の DNA 分析等に問題なく使用できる。また、DNA 情報が無い生物資源についても、次世代シーケンス解析を組み合わせることで、同定に利用できる葉緑体 DNA 等の DNA 情報を迅速に取得できることから、環境負荷の少ない同定検査技術としての利用が期待できると考える。

担当者 清水健志、青木央、木下康宣